

(TRANSLATION)

VIDEO MANUAL FOR EXPERIMENTS
IN
RICE PROTOPLAST CULTURE SYSTEM

by

YOSHIAKI OTSUKI

AGRICULTURAL RESEARCH CENTER

TOKYO

FOOD AND AGRICULTURAL RESEARCH DEVELOPMENT ASSOCIATION

1990

(TRANSLATION of pages 35-38)

EXPERIMENT OPERATION

In this item, methods and notandum regarding each culture step in the rice protoplast culture system will be described.

1. INDUCTION OF SEED CALLUS
2. LIQUID SHAKING CULTURE
3. PREPARATION AND CULTURE OF PROTOPLAST
 - (1) PRETREATMENT OF CULTURE CELL
 - (2) ISOLATION OF PROTOPLAST
 - (3) CULTURE OF PROTOPLAST
4. FORMATION OF COLONY AND REGENERATION OF PLANT BODY
 - (1) FORMATION OF COLONY
 - (2) PRETREATMENT FOR REDIFFERENTIATION
 - (3) REDIFFERENTIATION

[The bracketed numbers shown in the following pages indicate the cut numbers of "scenario".]

1. INDUCTION OF SEED CALLUS

1) Regarding experiment material

i) Fully ripened seed and immature embryo

In this experiment system, fully ripened seeds are used as material for somatic cell culture. There are many reports saying "immature embryo is better material for culture cell having high ability of plant body regeneration". In my laboratory, calli were induced from both fully ripened seeds and immature embryos to make liquid culture cell, and the two results were compared to each other. Then culture cell derived from immature embryos became stable earlier than that derived from fully ripened seeds. However, a critical difference between them could not be found, and therefore, in view of "supply for the year" and "easiness" of material, it was judged that fully ripened seeds were much better for use as the experiment material.

Further, the more the culture condition was improved, the more the ability of redifferentiation of the culture cell derived from fully ripened seeds was markedly improved.

ii) Method for selection of brown rice and surface sterilization (14)

After "hulling" is carried out, solid brown rice are selected and then subjected to sterilization operation. Immature rice, discolored rice, and cracked rice are preferably avoided, since there is the possibility of not being sterilized sufficiently. Attention should be paid so as not to sterilize brown rice by antiformin for many hours, because seeds will be killed due to the treatment.

iii) Site of seed in which callus is induced (24)

When brown rice are placed on a callus induction medium, firstly, blasts begin to move. Then, embryo parts gradually

expand to form calli. Depending on a rice cultivar, callus formation is poor, and in some cases, many roots grow, calli are formed at many points of a grown root, or calli are formed on a base part of a shoot. It seems to be thought that a callus formed expansion of an embryo part is derived from an embryonic disc.

If a callus was induced using only an embryo part extracted from brown rice, a better result might be obtained. However, it has not been tried.

2) Callus induction medium

i) MS (Murashige & Skoog, 1962) and N6 (N₆: Chu et al., 1975)

When MS medium was compared to N6 medium, a difference was barely found in the phase of callus induction. However, in the next culture phase, that is, liquid shaking culture, a callus induced using MS medium became a good culture cell earlier than that induced using N6 medium.

ii) Kind and concentration of hormone

When fully ripened rice seeds are used as the material, callus induction does not become stable, unless 2, 4-D, which is a strong auxin, is used. Comparison was carried out using 2, 4-D whose concentration was set in the range of 1-20 mg/l. Then, macroscopic difference could not be found in the range of 2-10 mg/l. Therefore, 2 mg/l, which is the minimum concentration for stable callus induction, was employed.

iii) Concentration of iron and EDTA

Referring to the report made by Kyojuka et al., (1987), a concentration of MS basal medium and 1/5 of the concentration were compared to each other regarding callus induction, liquid shaking culture, and redifferentiation. Then, an effect on proliferation could not be found. Only, a good culture cell which is pale in color was obtained in liquid shaking culture when 1/5 of the concentration was employed. Therefore, after

that, the same concentration (1/5 of the concentration) was employed in all media.

iv) Agar and Gel-Lite

As a gelatinizing agent for callus induction medium, commercially available agar powder and Gel-Lite were compared to each other. The case using Gel-Lite was noted to be more excellent in view of both quality and quantity of induced calli.

3) Contamination (abbreviated as "kontami", which means pollution by bacteria)

When fully ripened seeds are used as the material, there is little problem of contamination. In my case, two dishes of 9 cm are prepared and 5 seeds are placed on each dish. In the case of a rice cultivar which is frequently used in an experiment, "callus induction" is carried out at the frequency of about one time per month.

However, in some cases, the condition of the seed material is not good. It is thought that such a condition occurs when weather at the time of collecting seeds is not good, when seeds are collected in a place which is not suitable for planting the employed cultivar, and the like. In some cases, a few of bacteria grow in a dish, since sterilization cannot be carried out completely by the operation of surface sterilization. When hypha spreads due to pollution by a mold, the dish is preferably discarded. On the other hand, in the case of pollution by a bacterium, unless contamination spreads over the dish within 2-3 days after the placement of seeds, good seeds can be isolated from the polluted source by transferring those seeds to a new dish.

Contamination is feared in the culture experiment, especially in the culture experiments handling a higher plant. Risk of contamination becomes the highest when a plant piece is introduced into an incubator from outside. Once sterile

culture is successfully initiated, there are small opportunities for bacteria to get mixed in at the time of work in a clean bench.

4) Treatment in darkness (22)

Since light is not required for callus induction, prepared dishes are put into a drawer of a desk in a room for culturing at 25°C, or put into a stainless-steel can like a video, and left stacked.

5) State of induced callus (23)

When various cases of callus induction were compared using various cultivars as the material, seed callus was induced by most cultivars. A callus which is thought to be derived from embryonic disc grows in close contact to an embryo part. Regarding other parts, callus formation was observed on a base part of a shoot or around a root.

A callus derived from embryonic disc became a culture cell in good state after it was transferred to liquid culture. It was thought that cells obtained by liquid culture using calli growing around a root were "viscous", and they did not become good culture cells. However, it is not clear whether these results are universal or not, since there are only some examples.

6) Difference between rice cultivars in callus induction and liquid shaking culture

Regarding callus induction and liquid culture cell production, results obtained by using about 200 rice cultivars of model Indica cultivars and model Japonica cultivars were compared to each other. There were small cultivars in which a callus never grew.

In many model Indica cultivars, better calli were induced in a faster manner than those in model Japonica cultivars. However, many calli became black and died after they were

subjected to the next step. The main purpose of my experiment was to complete a protoplast culture system in a short period of time, and therefore, a counter measure for saving cultivars in which calli become black was not devised. Since differences between cultivars are clearly identified, it is important to find out a cultivar suitable for the culture for smoothly promoting the experiment.

実験映像マニュアル

イネ・プロトプラスト培養系
解 説

大槻 義昭

農業研究センター

In Hirochika

東京

社団法人

農林水産技術情報協会

1990

実験操作

この項ではイネ・プロトプラスト培養系における培養段階ごとに
手法の解説や注意事項等を述べる。

1. 種子カルスの誘導

2. 液体振盪培養

3. プロトプラストの調製と培養

① 培養細胞の前処理

② プロトプラスト単離

③ プロトプラスト培養

4. コロニー形成と植物体再生

① コロニー形成

② 再分化前処理

③ 再分化

(なお、以下のページで用いている() 内数字は“シナリオ”のカット番号を示す)

1. 種子カルの誘導

1) 実験材料について

① 完熟種子と未熟胚

この実験系では体細胞培養の材料に完熟種子を用いる。「植物体再生能の高い培養細胞は未熟胚を材料とした方がよい」との報告例が多数あり、私の研究室で、完熟種子と未熟胚の両方からカルスを誘導し、液体培養細胞にするところまでを比較した結果、未熟胚由来の培養細胞の方が早く安定状態になった。しかし、両者の間に決定的な差は見当たらず、材料の“年間供給”、“簡便さ”を考えると完熟種子を実験材料とした方がはるかに良いと判断した。

また、完熟胚由来の培養細胞は、培養条件が改良されるにつれて、再分化能も著しく高まった。

② 玄米の選び方と表面殺菌(14)

“初すり”を行った後、充実した玄米を選び、滅菌操作に移す。未熟なもの・変色したもの・ヒビ割れのあるものは、殺菌が十分にできない可能性があるので避けた方がよい。アンチホルミンでの殺菌が長時間になると、種子を殺してしまうので注意が必要である。

③ カルスが誘導される種子の部位(24)

玄米をカルス誘導培地に置床すると、まず芽が動き始める。次いで、胚の部分が膨らんできてカルスとなる。イネ品種によっては、カルスの形成が貧弱で、多数の根が生じるもの、そして発生した根のあちこちにカルスが出来てくるもの、または芽(shoot)の基部にカルスができるもの等がある。胚の部分が脹らんで出来たカルスは、胚盤由来とされているようである。

玄米から胚の部分だけを摘出して、カルス誘導をさせた方がよい結果が得られるかもしれないが、試していない。

2) カルス誘導培地

① MS(Murashige & Skoog, 1962)とN6(N₆: Chuら, 1975)

MS培地とN6培地を比較した結果、カルス誘導の段階では、差はほとんど認められなかった。しかし、次の培養段階である液体振盪培養で、MS培地で誘導したカルスが、N6培地で誘導したものより早く良好な培養細胞になった。

② ホルモンの種類と濃度

イネ完熟種子を材料とする場合は、強力なオーキシシンである2,4-Dを用いないとカル

ス誘導が安定しない。2,4-D の濃度は1 ~20 mg/l を比較した結果、2 ~10 mg/l の間では肉眼的な差を認めることはできなかった。そこで、安定したカルス誘導のための最低濃度である 2 mg/l を採用した。

③ 鉄・EDTAの濃度

Kyozuka ら(1987)の報告を参考に、MS 基本培地の濃度とそれの1/5 濃度を、カルス誘導、液体振盪培養、再分化のそれぞれについて比較した結果、増殖に対する影響は認められなかった。ただ液体振盪培養で、1/5 濃度のとき色のうすい良好な培養細胞が得られたため、以後は1/5 濃度として全培地で同じ濃度を採用した。

④ 寒天とゲルライト

カルス誘導培地のゲル化剤として、市販の粉末寒天とゲルライトを比較した結果、誘導されたカルスの質・量ともに ゲルライト を用いた場合の方が良好であった。

3) コンタミネーション (略して「コンタミ」=雑菌による汚染のこと)

材料が完熟種子であれば、コンタミの問題は少ない。私の場合は、9 cmのシャーレに5粒ずつ置床したものを2枚作り、実験でよく使うイネ品種の場合は、月に1回程度の頻度で「カルス誘導」を行っている。

しかし、材料種子の状態が必ずしも良くない場合がある。それは、採種時の天候が良くなかった場合とか、その品種の栽培適地でない場所で採種した場合などが考えられる。表面殺菌の操作で完全には殺菌できなかったためにシャーレの中で1粒、2粒と雑菌が生えてくこともある。カビによる汚染で、菌糸が広がってくる場合は、そのシャーレを捨てたほうが良い。一方、バクテリアによる汚染の場合は、種子の置床後2 ~3日以内に汚染がシャーレ全体に広がっていなければ、健全な種子を新しいシャーレに移すことにより、汚染源から隔離できる。

培養実験、特に高等植物を扱う培養実験ではコンタミが非常に恐れられている。コンタミの危険が一番大きいのは、植物片を外部から培養器の中に持ち込むときである。一旦、無菌培養がうまくスタートすれば、クリーンベンチ内での作業で雑菌が混入する機会は少ない。

4) 暗黒処理(22)

カルス誘導に光は必要ないので、25°Cの培養室内の机の引き出しに入れるか、ビデオのようにステンレス缶に入れ、積み重ねておく。

5) 誘導されたカルスの状況(23)

多くの品種を材料としてカルス誘導を比較した結果、ほとんどの品種で種子カルスは

誘導された。胚盤由来と考えられるカルスは、胚の部分に密着して生じる。それ以外の場所では、shootの基部とか根の周囲にカルスの形成がみられた。

液体培養に移してから、いい状態の培養細胞になるのは胚盤由来のもので、根から発生したカルスをもとに液体培養で得られた細胞は、“粘り”があるように思われた。そして、良好な培養細胞にはならなかった。しかし、例が少ないので普遍的かどうかはわからない。

6) カルス誘導と液体振盪培養におけるイネの品種間差異

インド型品種・日本型品種の合計 200近くのイネ品種を用いて、カルス誘導と液体培養細胞化を比較した。カルスが全くできないという品種は非常に少なかった。

インド型品種の多くで、日本型品種より早く、立派なカルスが誘導された。しかし、次のステップに移した直後に黒くなって死んでしまうものも多かった。私の実験の場合は、早くプロトプラスト培養系を完成させることが主目的で、黒くなる品種を救う対策は講じなかった。品種による差は歴然としているので、培養に適した品種を見つけだすのが実験の円滑な推進には重要である。

2 . 液 体 振 盪 培 養

1) 液体振盪培養と懸濁細胞培養

液体振盪培養（写真）とは、液体培地の中に組織・細胞を入れ、容器を振盪して行う培養方法のことを言う。培養する組織・細胞の大きさは問わない。一方、懸濁細胞培養は suspension cultureと呼ばれ、単細胞～極小細胞塊が懸濁状態で振盪培養されている。イネでは Toriyama, Hinata (1985), Abdullah ら(1986)がAA培地の中で振盪培養することにより懸濁培養細胞を得ている。しかし、これらの報告によると安定した懸濁培養細胞を得るにはフィルターによる濾過を繰り返し、6ヶ月から1年以上の期間を要すると記されている。そし

